

付 明,李胜华,张 婷,等. RP-HPLC 法测定湘西藤茶二氢杨梅素的含量[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):332-334.

RP-HPLC 法测定湘西藤茶二氢杨梅素的含量

付 明,李胜华,张 婷,胡 兴

(民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室/湘西药用植物与民族植物学湖南省高校重点实验室/
怀化学院生命科学系,湖南怀化 418008)

摘要:采用索氏提取法、乙醇浸提法、超声波-乙醇法提取藤茶中二氢杨梅素(dihydromyricetin,DMY),RP-HPLC 法测定其含量。结果表明,超声波-乙醇法提取率最高,采用 Sino chrome C₁₈柱,以甲醇-0.1%磷酸(体积比 27:73)为流动相,检测波长为 294 nm 时,线性关系良好($r=0.999\ 2$),平均加样回收率为 97.8%, $RSD=0.69\%$;重现性试验 RSD 为 0.33%,说明该方法准确、可信度高。湘西藤茶 DMY 含量在 5 月底达到最高,叶中约 25.43%,茎中约 6.22%,因此其最佳采摘时期为 5 月底。

关键词:藤茶;最佳采摘期;超声波-乙醇法;二氢杨梅素(DMY);RP-HPLC

中图分类号: R284.1;O657.7⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0332-03

藤茶别称显齿蛇葡萄(*Ampelopsis grossedentata*),属葡萄科蛇葡萄属。湘西少数民族将其制成保健茶,长年饮用可强身健体,还可治疗感冒、咽喉肿痛、黄疸型肝炎等症^[1]。藤茶有抗氧化作用^[2-3],含有大量黄酮类物质,其中主要是二氢杨梅素(dihydromyricetin,DMY)。有研究表明,藤茶叶中总黄酮含量达 45%^[4-5],DMY 含量达 16.32%~33.03%^[6],这是非常罕见的,吸引了许多学者开展相关研究。黄酮物质可抑制

脂质过氧化^[7]、抑菌^[8]、降血压、降血糖^[9-10]、减轻肝细胞变性和肿胀^[11]、增强单核巨噬细胞吞噬功能和溶血功能、抗肿瘤、祛痰止咳等。随着研究的深入,DMY 降血糖、抗氧化、抑菌、抗肿瘤等活性成为研究热点。本研究以湘西藤茶为原料,从索氏提取法、乙醇浸提法、超声波-乙醇法中选择 DMY 提取率最高的方法提取样品 DMY,再用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法对不同时期、不同部位 DMY 含量进行测定,确定湘西藤茶的最佳采摘时期,为其合理开发提供理论依据。

收稿日期:2013-09-15

基金项目:湖南省科技计划(编号:2013FJ6090);湖南省高校科技创新团队支持计划(编号:2010212);湖南省“十二五”植物学重点建设学科项目(编号:201142)。

作者简介:付 明(1966—),女,湖北荆门人,副教授,主要从事植物生物化学研究。E-mail:fm6988@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

藤茶采自湖南省怀化市。DMY 对照品(纯度 99%,湖南省张家界至诚生物有限公司);甲醇、磷酸(天津市科密欧化学试剂有限公司),均为色谱纯。

表 1 3 种不同地区枸杞中甜菜碱含量比较

枸杞种类	重复	质量(g)	体积(mL)	质量比(mg/mL)	含量(%)	RSD(%)
宁夏中宁枸杞	I	1.015 0	100	0.535	8.78	1.29
	II	1.013 6	100	0.522	8.58	
	III	1.016 3	100	0.535	8.77	
	平均				8.71	
青海枸杞	I	1.005 2	100	0.530	8.79	1.22
	II	1.014 1	100	0.524	8.61	
	III	1.008 9	100	0.533	8.80	
	平均				8.73	
甘肃枸杞	I	1.013 4	100	0.560	9.21	0.97
	II	1.013 7	100	0.569	9.36	
	III	1.012 4	100	0.559	9.20	
	平均				9.26	

3 结论

提取甜菜碱时采用《农业行业标准》中的《蒸馏水冷浸法》和《中华人民共和国药典》中的《80%乙醇热回流法》这 2 种方法作为提取甜菜碱的方法,比较这 2 种方法的甜菜碱得率

发现,采用《农业行业标准》的方法,甜菜碱得率为 3.35%,而采用《中华人民共和国药典》的方法,甜菜碱得率 3.13%,且蒸馏水冷浸法比 80%乙醇热回流法提取方法安全、简单易操作,成本低,因此选用《农业行业标准》作为提取甜菜碱的方法。

不同地区枸杞中的甜菜碱含量不同,可能与枸杞生长地域、环境、湿度、日照等生态环境因素有关,如枸杞作为中成药配伍使用时,应严格控制及规范枸杞产地、采摘期等,使中成药中枸杞的甜菜碱和多糖等指标符合药典规定。

参考文献:

[1] 谢 忱,徐丽珍,李宪铭,等. 枸杞子化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,2001,26(5):35-36.
[2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979:1518.
[3] 徐月红,何 岚,徐莲英,等. 枸杞的免疫药理研究进展[J]. 中药材,2000,23(5):295-298.
[4] 张宇金,高世勇,何立巍. 甜菜碱的生物活性研究[J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2006,22(1):13-16.
[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2009:232-233.

Waters 1525 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); JY98-IIDN 智能型超声波细胞粉碎机(浙江省宁波新芝生物科技股份有限公司);FW177 型中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 样品溶液的制备 将材料洗净、切段、干燥后粉碎并过 60 目筛,密封保存。

索氏提取法:取样品 2.0 g 置于索氏提取器中,回流提取 8 h,收集滤液,旋转蒸发浓缩后用 65% 乙醇定容至 100 mL。取 150 μ L 稀释后用 0.45 μ m 滤膜过滤制成相当于原料 0.3 mg/mL 的样品液 1。

乙醇浸提法:取样品 2.0 g 置于三角瓶中,加入 65% 乙醇,65 $^{\circ}$ C 下振荡提取 24 h,5 000 r/min 离心,收集滤液,用 65% 乙醇定容至 100 mL。同上处理得样品液 2。

超声波-乙醇提取法:取样品 2.0 g 加入 40 mL 65% 乙醇,于 65 $^{\circ}$ C 温水中浸提 2 h;用超声波处理 20 min,离心;滤渣再用 40 mL 65% 乙醇超声 25 min,离心;合并滤液,用 65% 乙醇定容至 100 mL。同上处理得样品液 3。

1.2.2 色谱条件的选择 选择色谱柱系 Sino chrom C₁₈ 柱(4.6 mm \times 150 mm,5 μ m);流速 1.0 mL/min;进样体积 20 μ L;柱温 31 $^{\circ}$ C;流动相为甲醇-水,分别用磷酸、磷酸二氢钠调节 pH 值,以不同的比例分别在 294、310 nm 波长处进样,根据峰形确定最佳的色谱条件。

1.2.3 标准曲线及线性关系考察 取干燥后的 DMY 粉末 0.010 6 g,用甲醇溶解、定容至 10 mL,配成 1.06 mg/mL 的 DMY 对照品液。分别取 DMY 对照品溶液 0.1、0.4、0.7、1.0、1.3、1.6、1.9 mL 于 25 mL 容量瓶中,用甲醇定容,配制不同浓度的对照品溶液。吸取各浓度对照品溶液 20 μ L,注入色谱仪,按确定的色谱条件测峰面积,以峰面积对 DMY 浓度绘制标准曲线。

1.2.4 二氢杨梅素含量的测定 将样品液 1、样品液 2、样品液 3 分别进样,测定峰面积。选择峰面积最大的提取方法分别制备不同时期采摘的藤茶茎提取液、叶提取液,在确定的色谱条件下进样,测定 DMY 含量。

$$\text{DMY 含量} = \frac{x \times 100 \times 10}{150 \times m} \times 100\%。$$

式中: x 为由标准曲线计算的样品中的 DMY 浓度(μ g/mL); m 为样品质量(mg)。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的确定

当采用甲醇-水为流动相时,出现拖尾;加入磷酸二氢钠时,拖尾现象稍有改善但分离效果不太好;加入磷酸时,消除了拖尾现象,峰形对称,分离效果好。将甲醇-0.1% 磷酸按(20~80):(20~80)进样,当甲醇、0.1% 磷酸体积比 27:73 时,对照品和样品的各组分达到了良好的分离,且保留时间适中。当检测波长为 294 nm 时,DMY 的峰无杂质干扰。因此,确定最佳色谱条件为 Sino chrom C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 150 mm,5 μ m),柱温 31 $^{\circ}$ C,检测波长 294 nm;流动相为甲醇-0.1% 磷酸(27:73),流速 1.0 mL/min;进样体积 20 μ L。按照该色谱条件将对照品和样品液分别进样,

RP-HPLC 图谱分别见图 1、图 2,DMY 保留时间约为 7.5 min。

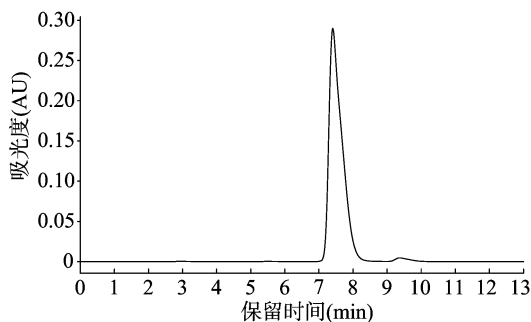


图1 DMY对照品HPLC图谱

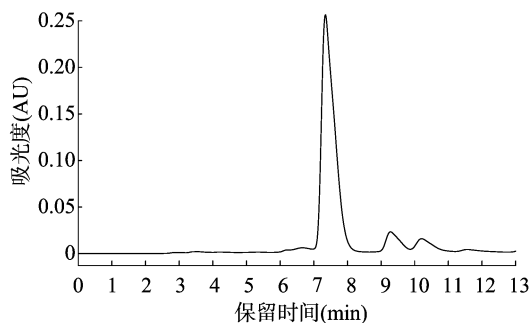


图2 藤茶样品HPLC图谱

2.2 标准曲线及回归方程的建立

以峰面积对对照品浓度绘制标准曲线,得回归方程 $y = 60\,055.848\,5x - 73\,641.974\,2$, $r = 0.999\,2$,说明在 4.24 ~ 80.56 g/mL 范围内峰面积与浓度呈良好的线性关系。

2.3 二氢杨梅素提取方法的确定

将样品液 1、样品液 2、样品液 3 分别在确定的色谱条件下进样,平均峰面积分别为 2 631 664、2 975 265、3 087 388 μ V \cdot s,样品液 3 的峰面积最大,说明超声波-乙醇法的提取效率最高,故采用超声波-乙醇法提取藤茶 DMY。

2.4 精密度和稳定性试验

取同一份对照品溶液重复进样 5 次,记录 DMY 的峰面积(表 1),计算 RSD 为 1.6%。

表 1 精密度试验结果

序号	峰面积 (μ V \cdot s)	RSD (%)
1	4 122 411	
2	3 999 518	
3	4 052 316	
4	4 085 690	
5	4 170 460	
平均	4 086 079	1.6

将同一份样品提取液每隔 2 h 进样 1 次,记录 DMY 的峰面积(表 2),计算 RSD 为 0.82%。结果表明,样品在 8 h 内稳定性良好。

2.5 重现性和回收率试验

取同一批次样品 6 份,按照相同的方法提取 DMY,并测定其含量,结果 RSD 为 0.33%(表 3),说明该方法的重现性好。

表 2 稳定性试验结果

时间 (h)	峰面积 ($\mu\text{V} \cdot \text{s}$)	RSD (%)
0	3 113 992	
2	3 062 116	
4	3 086 127	
6	3 127 451	
8	3 104 599	
平均	3 098 843	0.82

表 3 重现性试验结果

序号	样品质量 (g)	二氢杨梅素含量 (mg)	RSD (%)
1	1.98	349.56	
2	2.02	352.18	
3	2.00	350.08	
4	2.01	352.34	
5	1.98	350.26	
6	2.00	350.91	
平均		350.89	0.33

向同一份样品提取液中分别加入不同含量的对照品后测定峰面积,计算平均回收率为 97.8%,RSD 为 0.69%(表 4)。

表 4 回收率试验结果

样品 DMY 含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	RSD (%)
0.105	0.025	0.129 5	98.2	
0.105	0.050	0.153 4	96.8	
0.105	0.075	0.178 0	97.3	
0.105	0.100	0.203 2	98.2	
0.105	0.150	0.252 5	98.3	
平均			97.8	0.69

2.6 样品中二氢杨梅素含量的测定

藤茶茎、叶中 DMY 含量在 5 月底达到最高,叶中含量约 25.43%,茎中约 6.22%,之后 DMY 含量逐渐降低。4—9 月的藤茶茎、叶的 DMY 含量如图 3 所示。

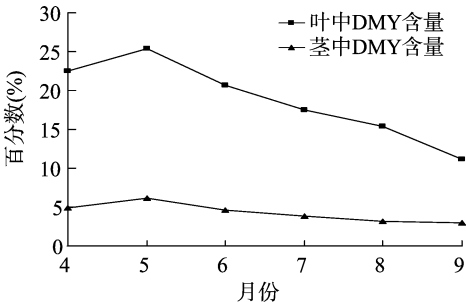


图3 不同采收时期藤茶茎、叶中DMY的含量

测定 DMY 含量的方法有分光光度法、比值-导数荧光法、HPLC 法等。何桂霞等用乙醇回流法提取显齿蛇葡萄中 DMY,用 Novapak - C₁₈ 柱于 25 ℃、290 nm 检测,叶中 DMY 含量最高达 31.25%,茎中最高达 9.2%^[12]。范世明等以乙腈-0.1% 磷酸(8:92)为流动相,用 HPLC 法测得闽产显齿

蛇葡萄叶中 DMY 含量为 33.03%,茎中为 4.49%^[6]。结果的差异可能是由材料来源、提取方法、采用的柱、流动相、柱温等不同造成的,也说明该植物在不同地区因地理、气候、海拔等因素不同,DMY 含量在不同季节有很大区别。本试验选择甲醇作流动相,是因为甲醇经济实惠,并且毒性较乙腈小;重现性试验的 RSD 为 0.33%,表明结果可信度高。

3 结论

本研究比较了 3 种提取方法,结果表明超声波-乙醇法提取样品 DMY 的时间最短、提取率最高,该法可以作为提取黄酮、DMY 的通用方法。

RP-HPLC 法具有快速省时、简便,方法灵敏、精密度高等特点,适合于藤茶 DMY 含量的测定。本研究测得湘西藤茶不同时期叶中 DMY 含量为 11.21%~25.43%,茎中为 3.0%~6.22%;在 5 月底采摘湘西藤茶,可使藤茶得到充分利用,保健价值高。

参考文献:

[1]熊 璞,姚茂君,肖凯军. 藤茶中二氢杨梅素的提取工艺研究[J]. 现代食品科技,2009,25(8):907-910.

[2]Wang Y F,Ying L,Sun D,et al. Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from *Ampelopsis grossedentata* stems: process optimization and antioxidant activity[J]. International Journal of Molecular Sciences,2011,12(10):6856-6870.

[3]Wang Y F,Bian X Y,Park J,et al. Physicochemical properties, in vitro antioxidant activities and inhibitory potential against α -glucosidase of polysaccharides from *Ampelopsis grossedentata* leaves and stems[J]. Molecules,2011,16(9):7762-7772.

[4]覃洁萍,梁山丹,何翠薇. 差示分光光度法测定广西瑶族藤茶中黄酮类成分的含量[J]. 中草药,2002,33(7):607-609.

[5]付 明,胡朝墩,周 亮,等. 藤茶黄酮含量及其体外抗脂质过氧化能力研究[J]. 食品工业科技,2013,34(7):146-148,214.

[6]范世明,梁一池,王河山. HPLC 法测定闽产显齿蛇葡萄中二氢杨梅素的含量[J]. 福建中医药大学学报,2012,22(1):46-47.

[7]徐静娟,姚茂君,郭敏辰. 二氢杨梅素生物功效的研究[J]. 食品科学,2008,29(11):622-625.

[8]萧力争,郭 维,刘素纯,等. 茶叶提取物与二氢杨梅素抑菌活性比较研究[J]. 安徽农业大学学报,2008,35(2):239-242.

[9]Dong H Q,Li M,Zhu F,et al. Inhibitory potential of trilobatin from *Lithocarpus polystachyus* Rehd against α -glucosidase and α -amylase linked to type 2 diabetes[J]. Food Chemistry,2012,130(2):261-266.

[10]Kumar S,Narwal S,Kumar D,et al. Evaluation of antihyperglycemic and antioxidant activities of *Saraca asoca* (Roxb.) De wild leaves in streptozotocin induced diabetic mice[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Disease,2012,2(3):170-176.

[11]郑 成,丘雅茹,招燕红,等. 藤茶中二氢杨梅素的中试规模微波提取及降血糖作用研究[J]. 广州大学学报:自然科学版,2007,6(6):26-31.

[12]何桂霞,裴 刚,杨伟丽,等. HPLC 测定藤茶不同采收时期及不同部位的二氢杨梅素含量[J]. 中成药,2004,26(3):40-42.